

平成 21 年 5 月 19 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790514
 研究課題名（和文） アンジオテンシノゲンノックアウトマウスを用いた心血管系における RAS 系の機能解析
 研究課題名（英文） Functional analysis for renin-angiotensin system in angiotensinogen deficiency mice
 研究代表者
 原田 睦生 (HARADA MUTSUO)
 山形大学・医学部・非常勤講師
 研究者番号：90431642

研究成果の概要：

アンジオテンシンを持たないアンジオテンシノゲンノックアウトマウスを用いて、心筋梗塞を作成しオルメサルタンによるアンジオテンシン非依存性の AT1 受容体抑制が梗塞後左室リモデリング形成に与える影響を検討した。定常状態よりレニン・アンジオテンシン活性が抑制されたノックアウトマウスではオルメサルタンによる左室リモデリング抑制などの心保護効果が減弱することが示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	0	1,500,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	510,000	3,710,000

研究分野：循環器内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：アンジオテンシン II、心筋梗塞、左室リモデリング

1. 研究開始当初の背景

アンジオテンシンは代表的な昇圧ホルモンであると同時に、心筋細胞肥大、心臓線

維化、血管平滑筋増殖などを促進する作用を持ち、心血管リモデリングに関与する。また、心臓局所に RAS 系の構成要素が存在し循環

RAS 系とは独立した調節を受けており、心血管系リモデリングは組織 RAS 系の関与が大きいとされる。

心臓に圧負荷がかかると心臓組織 RAS 系の発現が亢進し心肥大を呈する。当初アンジオテンシン が伸展刺激によって心筋細胞から分泌され、オートクライン的に心筋細胞上の AT1 受容体に作用することにより心肥大が生じると考えられていた。しかし最近 Zou らはアンジオテンシン を持たないアンジオテノゲンノックアウトマウスを用いて、伸展刺激それ自体がアンジオテンシンの存在と関係なく AT1 受容体を活性化させ、心肥大を生じることを報告した。またある種のアンジオテンシン 受容体拮抗薬 (ARB) がアンジオテンシンの作用に拮抗して (antagonist) 心肥大を抑制するのに対し、他の ARB (カンデサルタン) がアンジオテンシン 非依存的に直接 AT1 受容体に作用して AT1 受容体の活性化を抑制し (inverse agonist) 心肥大を抑えることを報告した (Nat Cell Biol. 2004 6(6):499-506)。一方、RAS 系は心肥大の形成過程のみならず、心筋梗塞後に生じる左室リモデリングの形成過程においても重要な役割を演じており、RAS 系の抑制が心筋梗塞後の予後を改善することはいくつかの大規模臨床試験により証明されている。しかしこの効果が組織アンジオテンシンの作用を抑制した結果によるものか、あるいはアンジオテンシン 非依存性の AT1 受容体活性化を抑制したことによるものかは詳細な検討がない。またアンジオテンシン は心筋肥大反応促進や心筋梗塞後左室リモデリング形成作用のほかに血管平滑筋増殖作用を示すことが示されているが、その効果が組織アンジオテンシンの作用によるものか、アンジオテンシン 非依存性の AT1 受容体の活性化によるものかは報告されていない。さ

らに ACE はアンジオテンシン からアンジオテンシン を産生すると同時に、血管拡張作用を持つブラジキニンを不活化することが知られているが、ACE-I による心筋梗塞後左室リモデリング抑制効果がアンジオテンシン 産生抑制によるものか、あるいはブラジキニンの不活化抑制による心臓保護効果によるものかは結論が出ていない。

2. 研究の目的

(1) アンジオテノゲンノックアウトマウスを用いて、心筋梗塞および血管障害モデルを作成する。そして inverse agonist の ARB (オルメサルタン) を投与してアンジオテンシン 非依存性の AT1 受容体活性化を抑制する。これによりアンジオテンシン 非依存性の AT1 受容体活性化が梗塞後左室リモデリング形成や血管平滑筋増殖に与える影響を明らかにする。また各種 ARB (ロサルタン、カンデサルタン、オルメサルタン、バルサルタン) を用いることにより、各 ARB 間の心筋細胞や平滑筋細胞に対する効果の差異を明らかにし、そのメカニズムを解明する。

(2) アンジオテンシン が存在しないアンジオテノゲンノックアウトマウスに心筋梗塞を作成する。これに ACE-I を投与してブラジキニンの不活化を抑制する。これによりアンジオテンシン 抑制でなくブラジキニン不活化を介した ACE-I の心臓保護効果を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) アンジオテンシノゲンノックアウトマウスの繁殖を継続し、十分数のマウスを確保する。これに Osmotic minipump を移植し生食群とオルメサルタン群の 2 群に振り分け、オルメサルタンの生体に与える効果を術前と 2 週間後、4 週間後の 3 回に分けて血圧と心拍数、体重を指標に比較する。野生型マウスにおいても同様に計測を行いアンジオテンシノゲンノックアウトマウス群と比較する。

(2) 次にマウスを全身麻酔・開胸下に左冠動脈前下行枝を結索することにより心筋梗塞モデルを作成し、生食群とオルメサルタン群に振り分け、偽手術群と比較する。比較項目は前述の血圧、心拍数、体重のほかに心臓超音波による左室収縮能と左室の形態学的評価、さらに心臓カテテル検査による心内血行動態評価も加える。野生型マウスにおいても同様に計測を行いアンジオテンシノゲンノックアウトマウス群と比較する。

(3) 4 週間後に上記マウスはすべて屠殺し心臓を取り出し、ヘマトキシレンエオジン染色とマッソントリクローム染色により組織学的評価を行う。また一部の心筋組織は蛋白抽出後にウェスタンブロット法を用いて分子生物学的に蛋白発現を検討する。

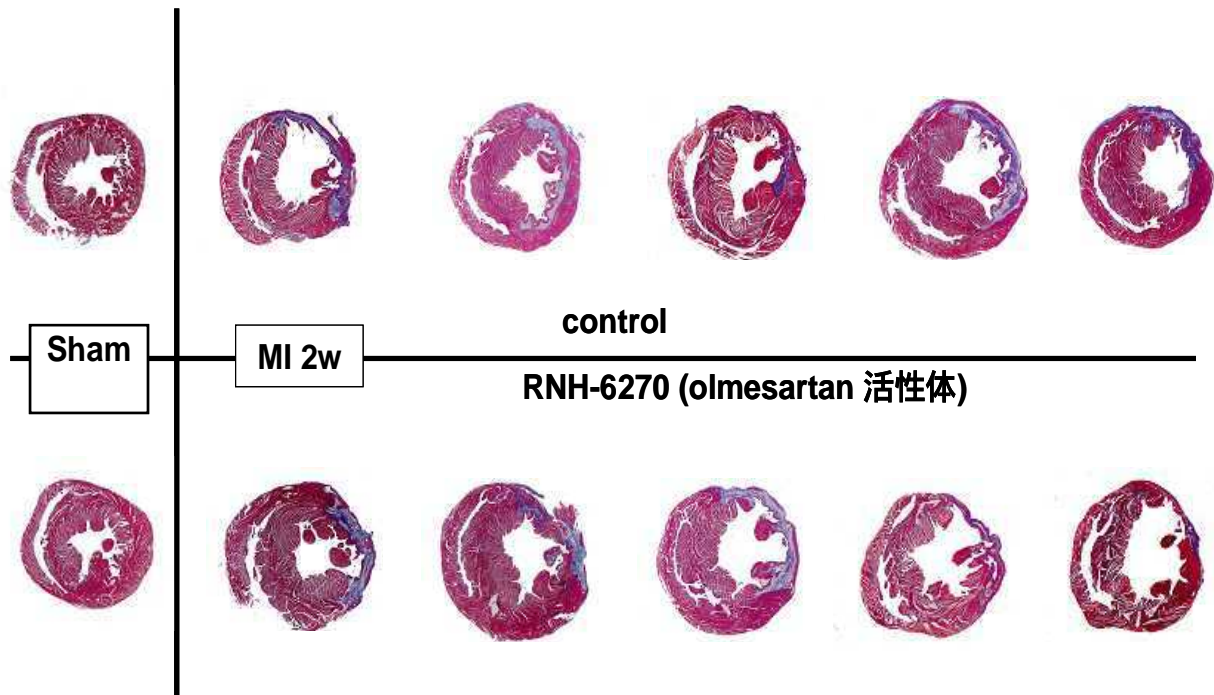
心筋梗塞モデルのほかに、ワイヤーによる頸動脈血管内皮障害モデルを作成し、上記と同様に 2 群に分けて、偽手術モデルと比較検討を行う。

4. 研究成果

本研究ではアンジオテンシン を持たないアンジオテンシノゲンノックアウトマウス(アンジオテンシノゲンノックアウトマウ

ス)を用いて、心筋梗塞を作成し inverse agonist の ARB (オルメサルタン)によるアンジオテンシン 非依存性の AT1 受容体抑制が梗塞後左室リモデリング形成に与える影響を明らかにした。8 週齢に達したアンジオテンシノゲンノックアウトマウスは定常状態で血圧 60 台と低血圧を認めた。これらのマウスに osmotic minipump を用いてオルメサルタンもしくは生食を 4 週間投与し同様の計測を行なった。野生型マウスにおいては生食群が血圧 100 台あるのに対しオルメサルタン群は血圧 60 台と、有意に血圧を低下させた。しかしアンジオテンシノゲンノックアウトマウスでは有意な血圧低下は認めなかった。これはアンジオテンシノゲンノックアウトマウスがすでにレニン・アンジオテンシン系(RAS) が抑制されており、定常状態で AT1 受容体がほぼ完全に不活化されていることが示唆された。これらのマウスに心筋梗塞を作成し、心エコー検査により観察を行なうと、生食を投与したアンジオテンシノゲンノックアウトマウスは野生型マウスと比較して有意に心収縮能の低下が抑制され、左室内腔の拡大も抑制された。アンジオテンシノゲンノックアウトマウスではオルメサルタン投与群と生食投与群で、この心保護効果に有意差を認めなかった。オルメサルタンを投与した野生型マウスでは有意な心保護効果を認めることから、心保護効果は RAS 活性の抑制に依存しており、定常状態で十分に RAS 活性が抑制されたアンジオテンシノゲンノックアウトマウスでは AT1 受容体拮抗薬であるオルメサルタンの効果が出現しにくいことが示唆された。

図 1



野生型マウスに心筋梗塞を作成し、オルメサルタンによる梗塞サイズの縮小効果を観察したが、2週間の時点では図1のように有意な差を認めなかった。今後虚血再灌流モデルなどの検討が考慮される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

Arimoto T, Sukekawa H, Harada M, Takayama S, Ikeno E, Nisugi K, Takeishi Y, Kubota I. Short cardiac iodine-123-metaiodobenzylguanidine imaging protocol in heart failure. *Circ J.* 2008;72(7):1106-11. (査読あり)

Kitahara T, Takeishi Y, Harada M, Niizeki T, Suzuki S, Sasaki T, Ishino M, Bilim O, Nakajima O, Kubota I. High-mobility group box 1 restores cardiac function after myocardial infarction in transgenic mice. *Cardiovasc Res.* 2008;80(1):40-6. (査読あり)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 睦生 (HARADA MUTSUO)
山形大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：90431642

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者